

Ingeniería Genética II

Unidad IX

RNAs no codificantes
Aplicaciones del iRNA

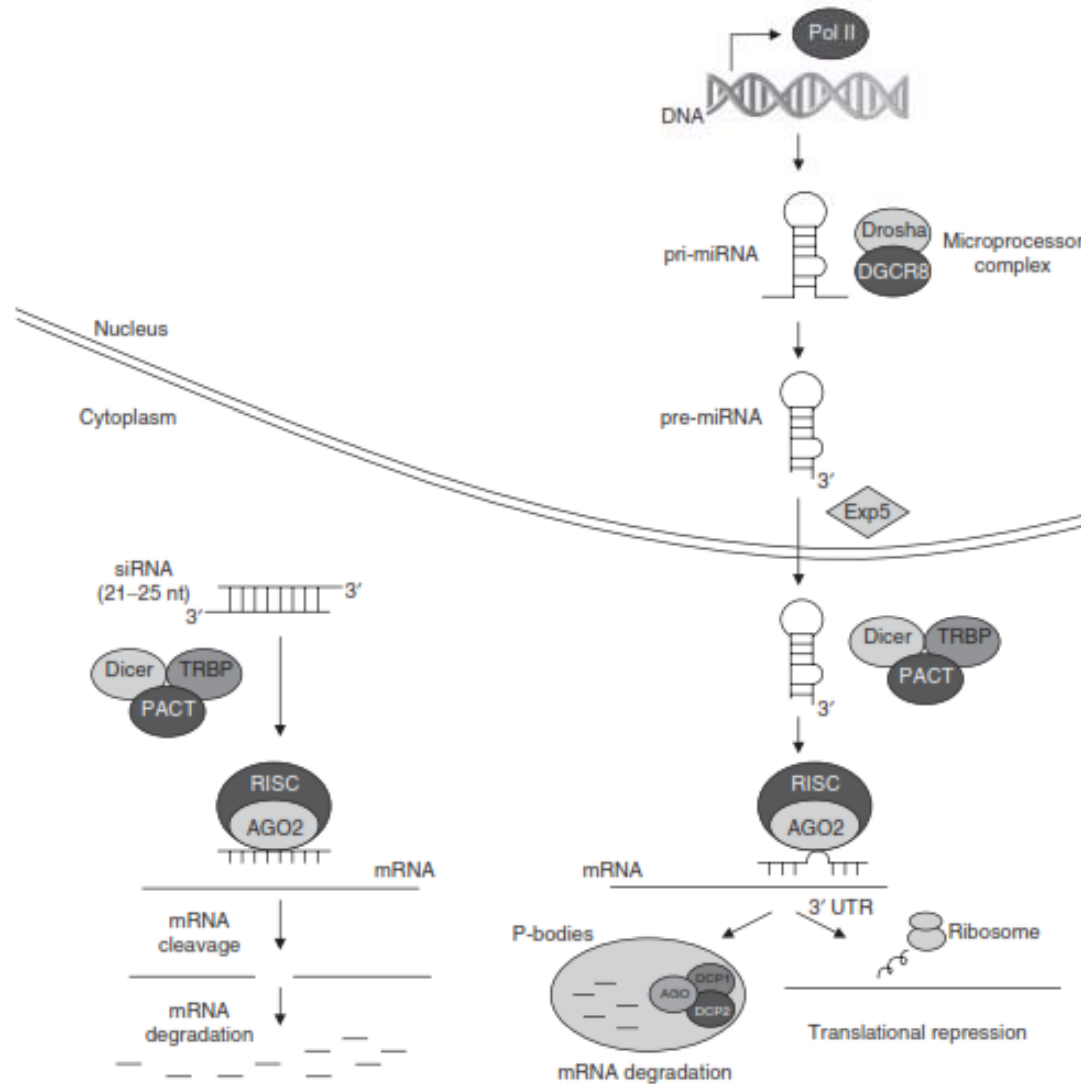
RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA

- El **mecanismo de interferencia de RNA** ha sido descrito en numerosos organismos.
- Su mecanismo, conocido como **PTGS** (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) o **Knock down génico** involucra la existencia de un dsRNA pequeño y la participación de varias enzimas intracelulares.
- Su papel en los organismos es central, tanto para la **regulación de la expresión génica**, como para **proteger a la célula de infecciones virales**.
- Ante este panorama, se han desarrollado **estrategias experimentales** para aprovechar el mecanismo de interferencia en **biología molecular básica y aplicada**.

RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA



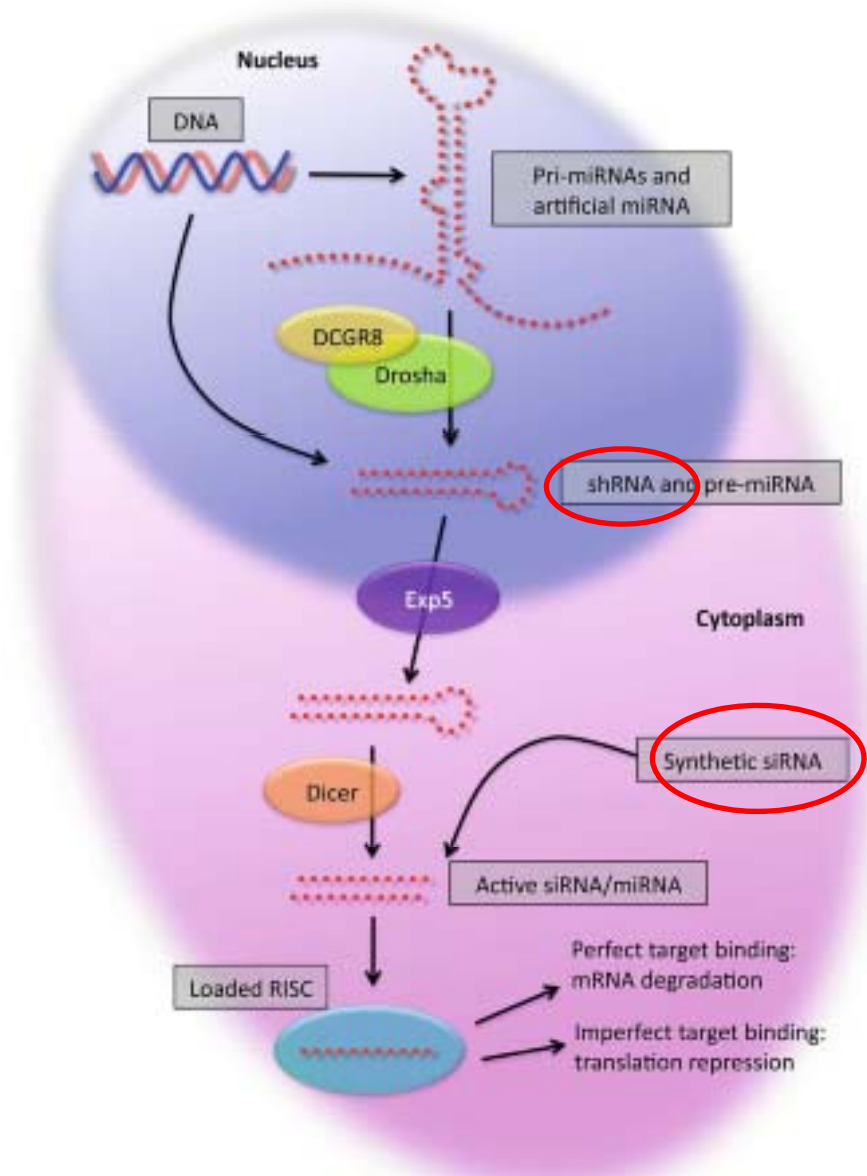
RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA

- El **aprovechamiento** del mecanismo de interferencia de RNA o **iRNA** se **basa** en la **introducción** dentro de la célula de **sdsRNA** (*small dsRNAs*) o de la **síntesis** endógena de **shRNA** (*short hairpin RNAs*).
- Los **sdsRNAs** son **sintéticos** mientras que los **shRNAs** son derivados de la **expresión de genes** **construidos *ad hoc***.
- Tanto en biología básica como aplicada, la **utilización** de **iRNA** pretende **evitar** la **traducción de un mRNA** con el fin de responder preguntas científicas o de constituir una terapia.
- En cualquiera de los dos casos, es **necesario diseñar adecuados sdsRNAs o shRNAs** y **evaluar** los **procedimientos** de su **vehiculización** dentro de las células diana.

RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA



RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA

Biología básica

***Knock down* génico** en modelos celulares o de organismos para **estudiar funciones celulares y orgánicas.**

Biología aplicada

Diseño de terapias basadas en RNAi para el **control de enfermedades** tales como:

- *Diferentes tipos de cáncer,*
- *Diversas patologías genéticas,*
- *Procesos anómalos del metabolismo,*
- *Alergias y procesos inflamatorios,*
- *Infecciones virales y de otros parásitos intracelulares.*

RNAs no codificantes

Aplicaciones del iRNA

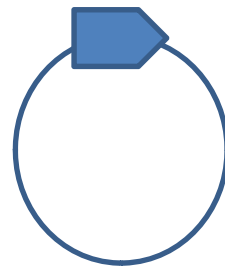
En **cualquiera** de las **posibles utilizaciones** del mecanismo del **iRNA**, es **necesario considerar** lo siguiente:



siRNA sintético



shRNA de síntesis endógena



Construcción genética



Sistema de delivery o vehiculización a la célula diana

¿Cuáles son los requerimientos para la síntesis de siRNA?

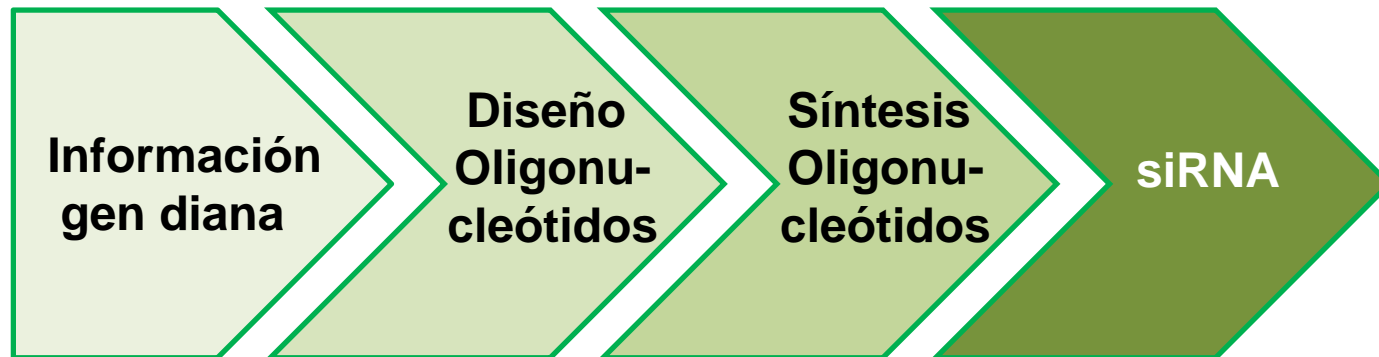


siRNA sintético

siRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Flujo de trabajo en la generación de siRNAs



iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- Las **secuencias diana** deberían estar a **50-100 pb *downstream*** del ATG.
- **Secuencias** muy **adecuadas** son **AA(N19)TT** o **NA(N21)**, o **NAR(N17)YNN**, donde N es cualquier nucleótido, R es una purina (A,G) e Y es pirimidina (C,U).
- El **contenido** de GC de la secuencia blanco debería estar entre **35-60%**.
- Se deben **evitar repeticiones** de **4 o más nucleótidos**.
- **Evitar secuencias** de los **UTRs**, aunque pueden ser funcionales.
- **Evitar secuencias** con **alta homología** a otros genes.

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- La **fente** de la **información** es conveniente que sea **secuencia transcriptómica**, dado que así se tiene evidencia previa que la región elegida sea transcripta.
- Es conveniente **diseñar varios siRNA distintos** para el *knock down* de un gen, dado que algunos pueden funcionar mejor que otros (en general, 4 siRNAs).
- Los **nucleótidos** de los **extremos** (*overhang*) es conveniente que sean **dNTPs** (reducen costos y son más resistentes a la acción de nucleasas).
- También, es **recomendable** para dar mayor resistencia a las nucleasas que los **nucleótidos** de los **extremos** estén modificados en sus grupos fosfato (**fosforotioatos**).

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Consideraciones en la síntesis de siRNAs



- **Reynolds** y colaboradores* definieron un **score numérico** para considerar en el **diseño de siRNA**.
- El **valor umbral** que debe dar el **score** es **6**.
- Todos los que den un **resultado mayor a 6** son **considerados buenos** candidatos para **siRNA**.
- Es **recomendable** también **diseñar un siRNA control** que **no** tenga **homología significativa** con el **genoma** de la célula en estudio.

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Criteria	Description	Score	
		Yes	No
1	Moderate to low (30%-52%) GC Content	1 point	
2	At least 3 A/Us at positions 15-19 (sense)	1 point /per A or U	
3	Lack of internal repeats (Tm* < 20°C)	1 point	
4	A at position 19 (sense)	1 point	
5	A at position 3 (sense)	1 point	
6	U at position 10 (sense)	1 point	
7	No G/C at position 19 (sense)		-1 point
8	No G at position 13 (sense)		-1 point

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Ejemplo en el diseño de siRNA...

Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA, NM_003380

```

1 GGGCGCGCCA GAGACGCAGC CGCGCTCCCA CCACCCACAC CCACCGCGCC CTCGTTCGCC
61 TCTTCTCCGG GAGCCAGTCC GCGCCACCGC CGCCGCCAG GCCATCGCCA CCCTCCGCAG
121 CCATGTCCAC CAGGTCCGTG TCCTCGTCCT CCTACCGCAG GATGTTCCGC GGCCCGGGCA
181 CCGCGAGCCG GCCGAGCTCC AGCCGGAGCT ACGTGACTAC GTCCACCCGC ACCTACAGCC
241 TGGGCAGCGC GCTGCGCCCC AGCACCAGCC GCAGCCTCTA CGCCTCGTCC CCGGGCGGCG
301 TGTATGCCAC GCGCTCCTCT GCCGTGCGCC TGC GGAGCAG CGTGCCCGGG GTGCGGCTCC
361 TGCAGGACTC GGTGGACTTC TCGCTGGCCG ACGCCATCAA CACCGAGTTC AAGAACACCC
421 GCACCAACGA GAAGGTGGAG CTGCAGGAGC TGAATGACCG CTTCGCCAAC TACATCGACA
481 AGGTGCGCTT CCTGGAGCAG CAGAATAAGA TCCTGCTGGC CGAGCTCGAG CAGCTCAAGG
541 GCCAAGGCAA GTCGCGCCTA GGGGACCTCT ACGAGGAGGA GATGCGGGAG CTGCGCCGGC
601 AGTGGACCA GCTAACCAAC GACAAAGCCC GCGTCGAGGT GGAGCGCGAC AACCTGGCCG
  
```

AA(N19)TT

```

Vimentin cDNA: 5' AACTACATCGACAAGGTGCGCTT
                  |||
sense siRNA: 5' CUACAUCGACAAGGUGCGC-dTdT
                  |||
antisense siRNA:3' dTdT-GAUGUAGCUGUUCCACGCG 5'
  
```

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Ejemplo en el diseño de siRNA...

Homo sapiens vimentin (VIM), mRNA, NM_003380

```

1 GGGCGCGCCA GAGACGCAGC CGCGCTCCCA CCACCCACAC CCACCGCGCC CTCGTTCGCC
61 TCTTCTCCGG GAGCCAGTCC GCGCCACCGC CGCCGCCAG GCCATCGCCA CCCTCCGCAG
121 CCATGTCCAC CAGGTCCGTG TCCTCGTCCT CCTACCGCAG GATGTTCCGGC GGCCCGGGCA
181 CCGCGAGCCG GCCGAGCTCC AGCCGGAGCT ACGTGACTAC GTCCACCCGC ACCTACAGCC
241 TGGGCAGCGC GCTGCGCCCC AGCACCAGCC GCAGCCTCTA CGCCTCGTCC CCGGGCGGCG
301 TGTATGCCAC GCGCTCCTCT GCCGTGCGCC TGC GGAGCAG CGTGCCCGGG GTGCGGCTCC
361 TGCAGGACTC GGTGGACTTC TCGCTGGCCG ACGCCATCAA CACCGAGTTC AAGAACACCC
421 GCACCAACGA GAAGGTGGAG CTGCAGGAGC TGAATGACCG CTTCGCCAAC TACATCGACA
481 AGGTGCGCTT CCTGGAGCAG CAGAATAAGA TCCTGCTGGC CGAGCTCGAG CAGCTCAAGG
541 GCCAAGGCAA GTCGCGCCTA GGGGACCTCT ACGAGGAGGA GATGCGGGAG CTGCGCCGGC
601 AG▲TGGACCA GCTAACCAAC GACAAAGCCC GCGTCGAGGT GGAGCGCGAC AACCTGGCCG
  
```

AA(N19)TT

```


Vimentin cDNA: 5' AACTACATCGACAAGGTGCGCTT
                |||
sense siRNA: 5' CUACAUCGACAAGGUGCGC-dTdT
                |||
antisense siRNA:3' dTdT-GAUGUAGCUGUUCCACGCG 5'
  
```

dNTPs (más económicos y resistentes a nucleasas)

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Síntesis de oligonucleótidos para siRNA

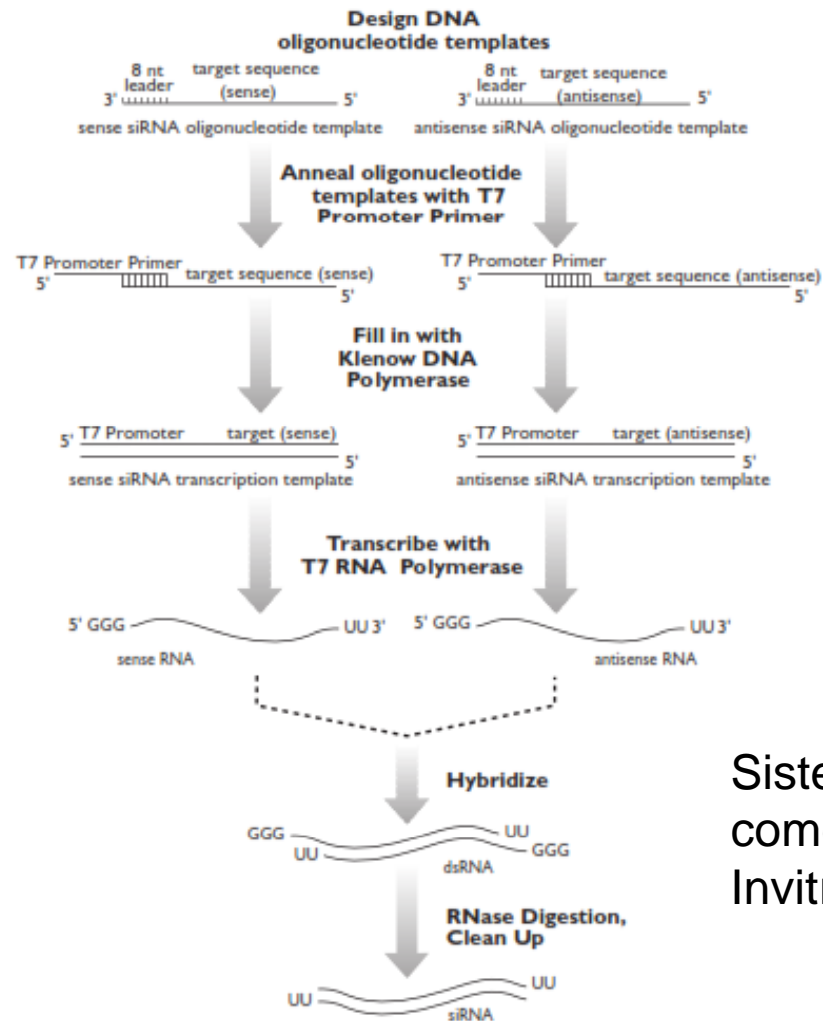


- Una vez **diseñados**, los **oligonucleótidos** son **sintetizados** mediante **procedimientos químicos** tradicionales.
- Cuando se disponen de los **dos oligonucleótidos** (*sense* y *antisense*), los mismos deben ser **mezclados en iguales cantidades** moleculares en un **buffer** adecuado (Acetato de potasio 100 mM; HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4; Acetato de Magnesio 2mM).
- Se debe **calentar 1 minuto a 90°C**, y luego **incubar 1 hora a 37°C**.
- Muchas **empresas comercializan** los **siRNAs** ya **preparados**, e incluso ofrecen muchos siRNAs validados para numerosos genes de distintos organismos.

iRNAs en biología

Generación de siRNAs sintéticos

Una alternativa para la generación de siRNAs :

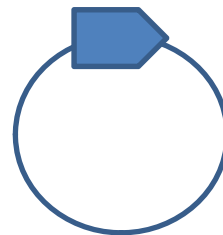


Sistema comercializado por Invitrogen

¿Cuáles son los requerimientos para la generación de shRNAs a partir de construcciones genéticas?



shRNA de síntesis endógena

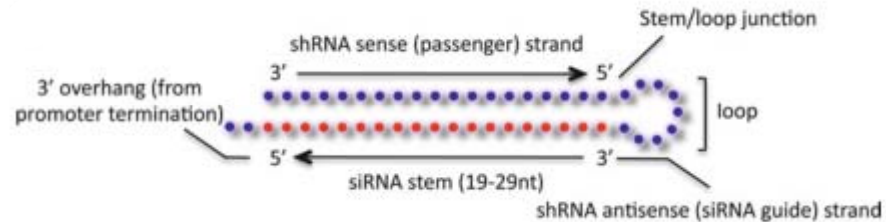
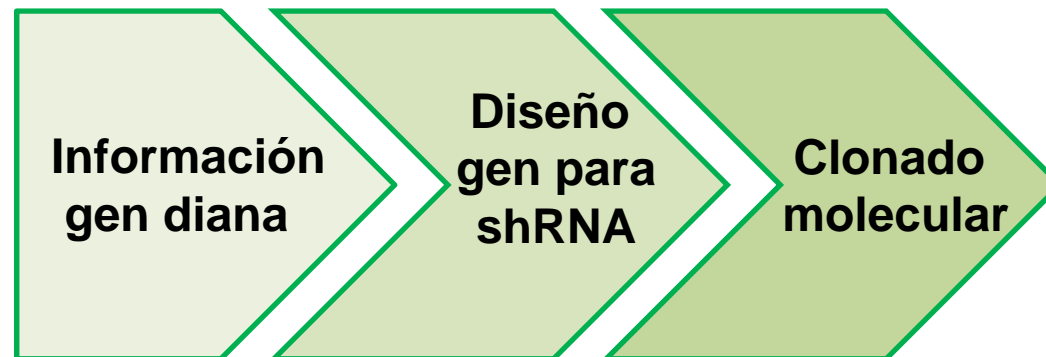


Construcción genética

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Flujo de trabajo en la generación de shRNAs



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Consideraciones en el diseño del gen para shRNA



- Los **shRNAs** son **transcriptos** que serán **generados** dentro de la **célula diana**.
- Por ende, es **necesario** realizar una **construcción genética** que contenga un gen adecuado que exprese el shRNA apropiado para el gen que se desea silenciar.
- Esto **requerirá** de un **clonado molecular** completo en *Escherichia coli*, requiriéndose para tal fin de un plásmido que actúe de plataforma, y de la constitución de un inserto que derive en la generación del shRNA.
- Así, esta **construcción genética contendrá** un **gen funcional** en la célula diana donde se desea silenciar el gen, el cual debería generar un transcripto que sea procesado por la maquinaria celular responsable de la interferencia del RNA.

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Consideraciones en el diseño del gen para shRNA



- El **gen** que se debe construir **debe contener** los **componentes sintácticos adecuados** para que sea funcional en la célula en estudio.
- Así, pueden utilizarse **promotores para RNA pol II** (típicos de los genes de miRNA), o **promotores para RNA pol III**.
- Una **ventaja** de los **segundos** es que son **muy fuertes** y el **producto** de RNA **no posee el tag de poly A** en el extremo 3'.
- En cualquier de los casos, la **región transcribible** debe **generar un dsRNA**.

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Clonado molecular para shRNA

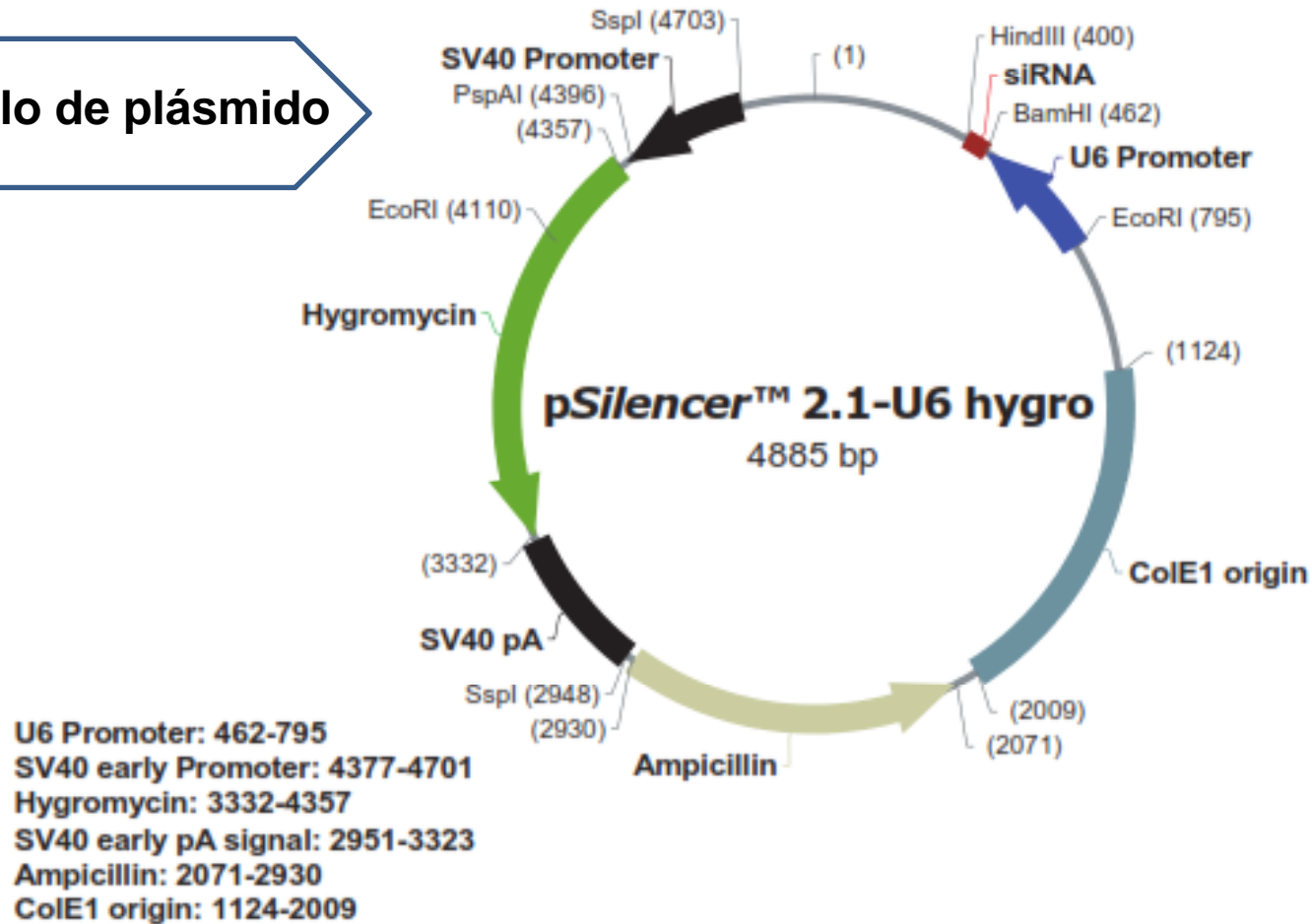


- 1) Objetivo: silenciar un gen en estudio.
- 2) Diseño de la molécula.
- 3) Aislamiento de plásmido (MCS flanqueado por regiones adecuadas para la transcripción dentro de la célula en estudio).
- 4) Aislamiento de inserto (generación de *sense/loop/antisense*)
- 5) Apertura del plásmido.
- 6) Compatibilización de extremos.
- 7) Ligación de plásmido e inserto.
- 8) Transformación en *Escherichia coli*.
- 9) Selección de Bacterias transformantes.
- 10) Selección de Bacterias conteniendo la construcción genética de interés.

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

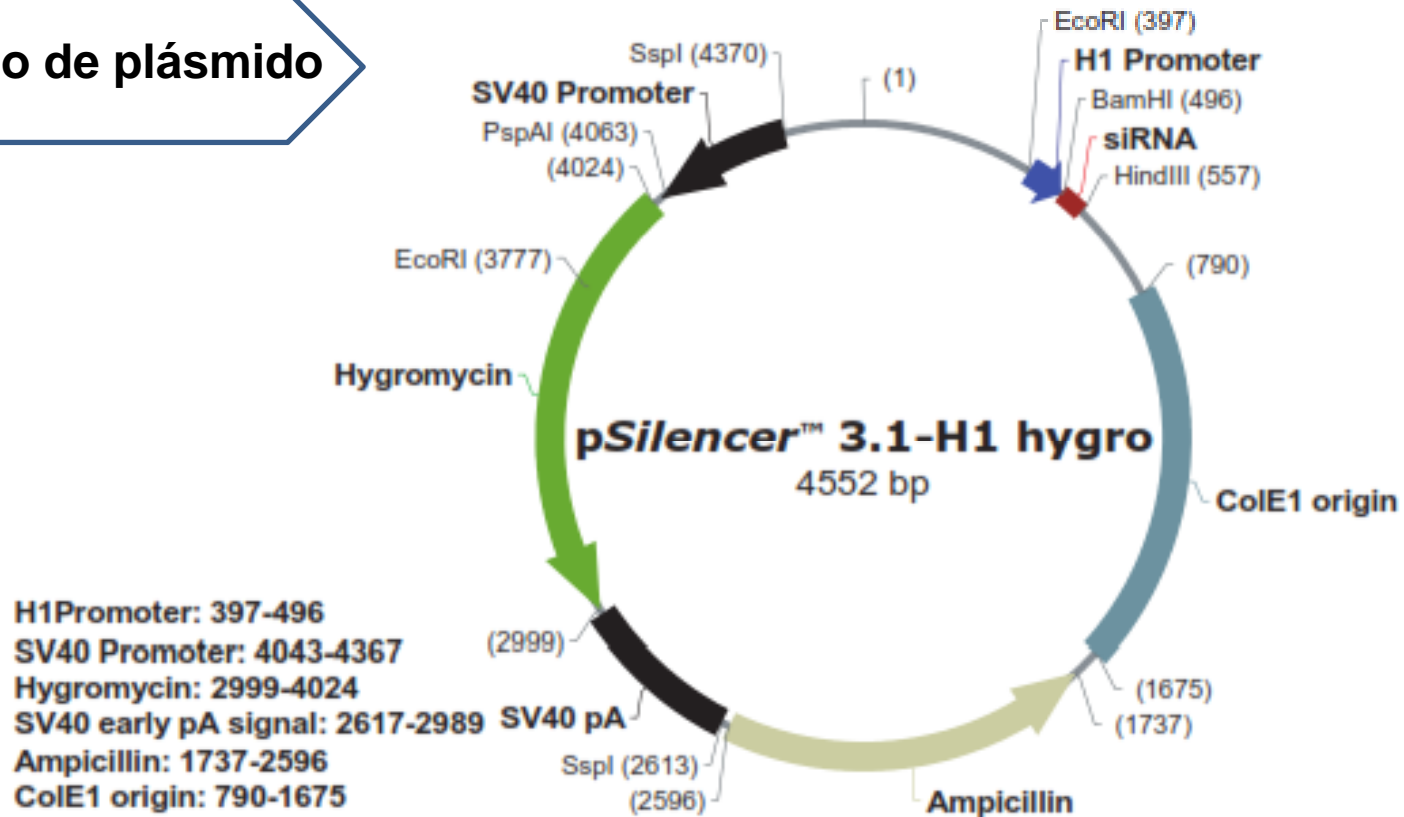
Ejemplo de plásmido



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Ejemplo de plásmido

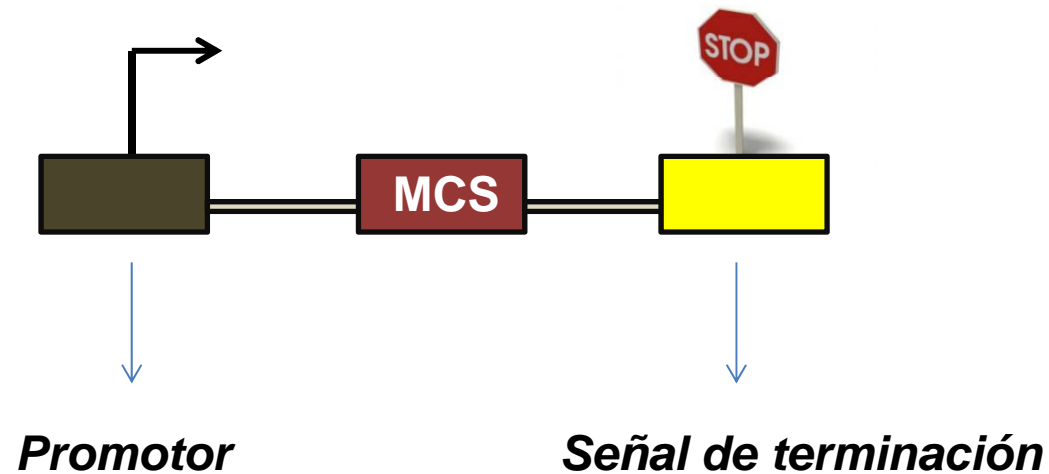


iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Región de clonado

Los **plásmidos** para **generar shRNA** contienen la siguiente región de clonado:

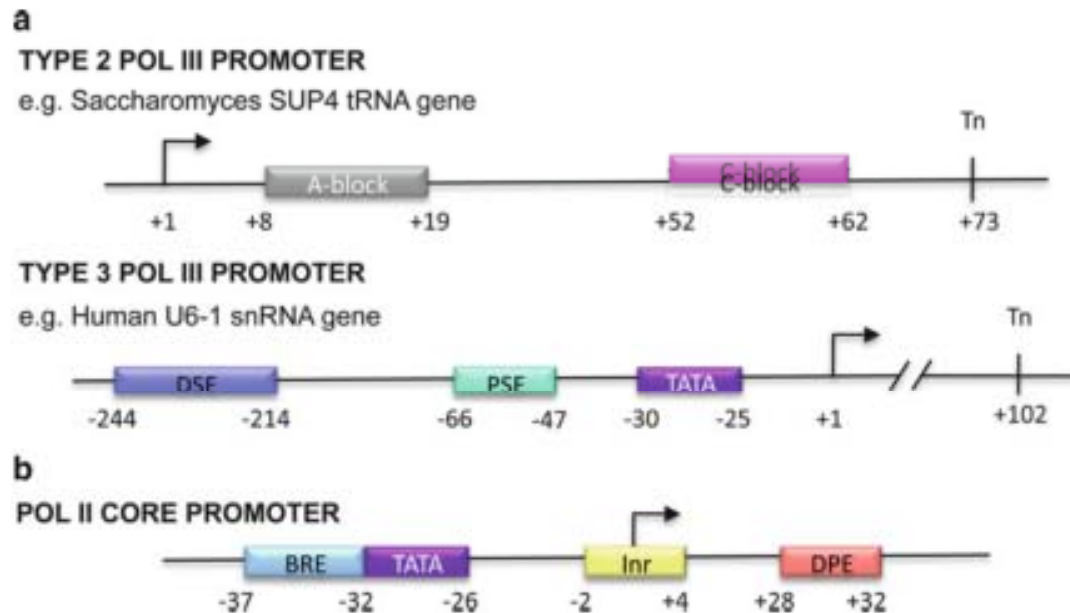


iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Promotores

Los promotores más empleados son los de RNA pol III y RNA pol II:



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Promotores

Las **ventajas** del uso de los **promotores** para **RNA pol III** son:

- *Son promotores compactos y fuertes.*
- *Producen en la célula sncRNAs*
- *Tienen señales de terminación pequeñas (4-5 timidinas) dejando extremos 3' precisos.*

En general, los **más utilizados** son los **promotores H1 y U6**.

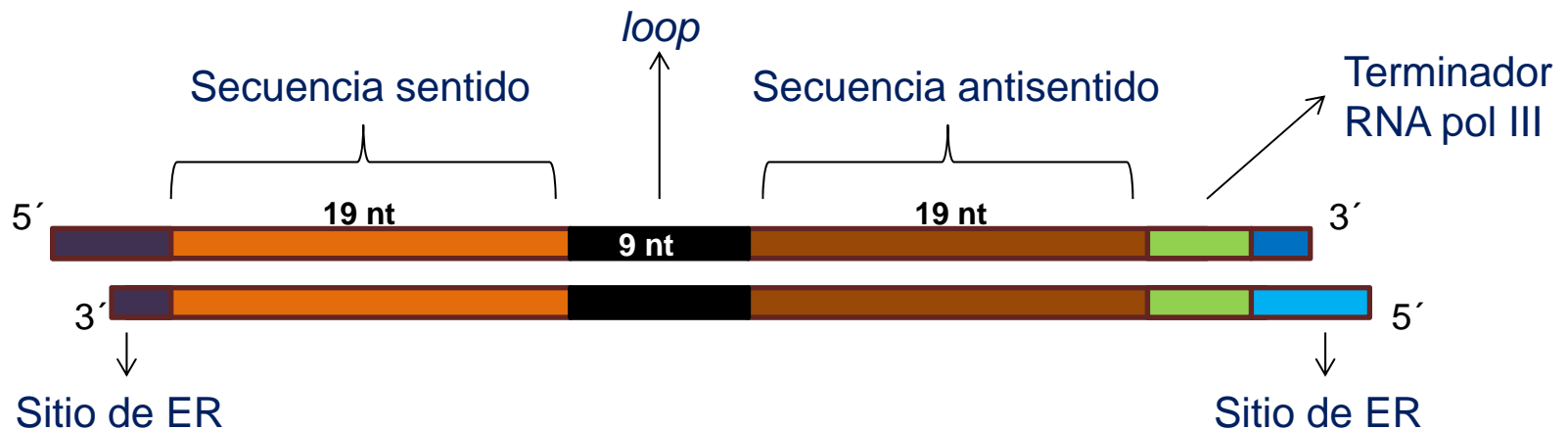
iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Insertos

- Para la **generación del inserto**, es necesario **considerar los mismos criterios** que en el **diseño y síntesis de siRNA** antes descritos.

- De este modo, una vez **detectadas las regiones potenciales** para silenciar (de 2 a 4 por gen), **deben diseñarse oligonucleótidos** de ssDNA que posean las siguientes características:



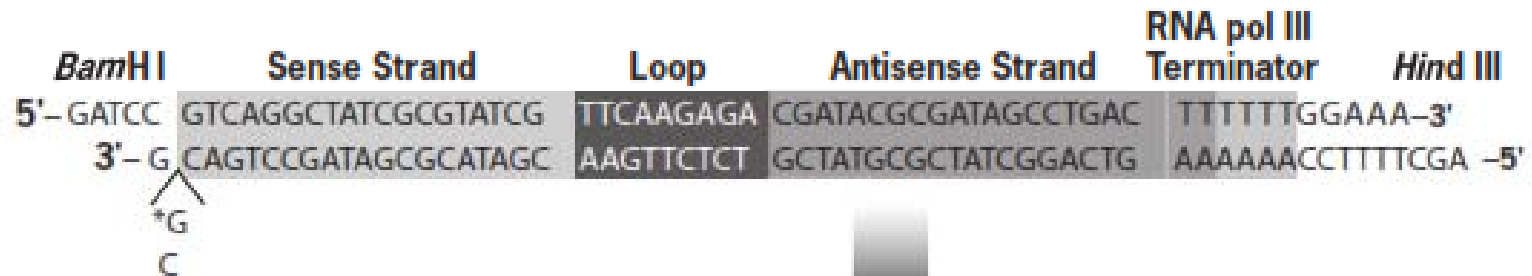
iRNAs en biología

Generación de shRNAs

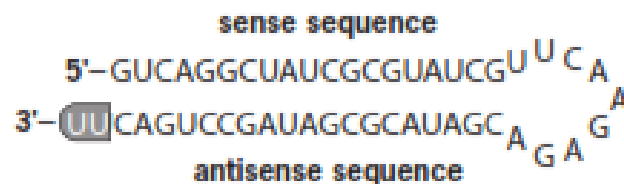
Example Target Sequence (AA plus 19 nt)



Annealed Hairpin siRNA Template Insert (order these 2 oligonucleotides)



Hairpin siRNA Structure



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Otros ejemplos de insertos para vectores con promotores de RNA pol III...



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Ejemplos de insertos para vectores con **promotores de RNA pol II...**

BamH I	sense sequence (19 nt)	loop	antisense sequence (21 nt)	Hind III	
5'- GATCC	GACGAGTTGACTGCGATTG	TTCAAGAGA	CAATCGCAGTCAACTCGTC	AG	A - 3'
3'- G	CTGCTCAACTGACGCTAAC	AAGTTCTCT	GTTAGCGTCAGTTGAGCAG	TC	TTCGA - 5'

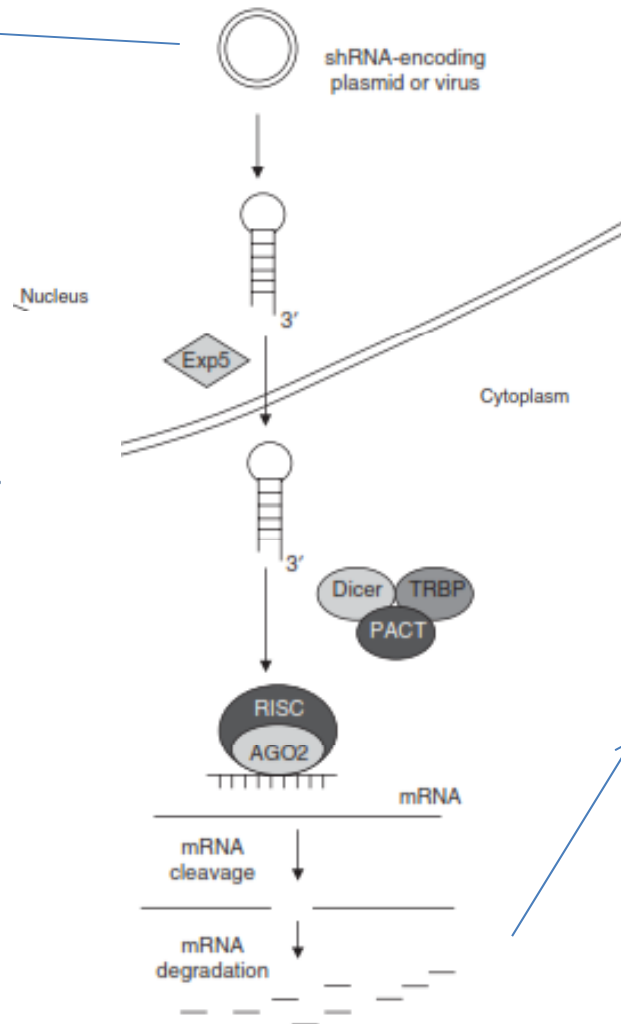
Xho I	sense sequence (19 nt)	loop	antisense sequence (21 nt)	Spe I	
5'- TCGAG	GACGAGTTGACTGCGATTG	TTCAAGAGA	CAATCGCAGTCAACTCGTC	AG	A - 3'
3'- C	CTGCTCAACTGACGCTAAC	AAGTTCTCT	GTTAGCGTCAGTTGAGCAG	TC	TGATC - 5'

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Construcción genética

Mecanismo de los shRNA

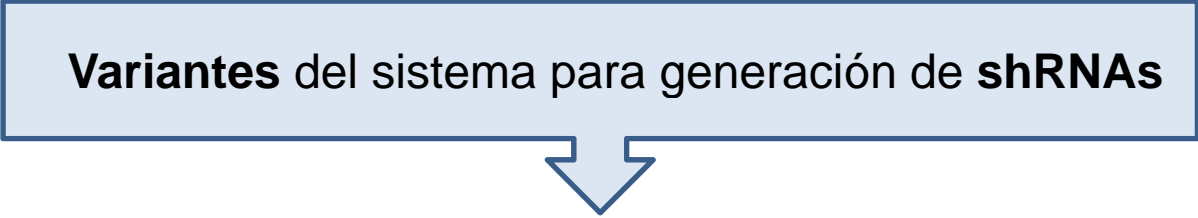


Silenciamiento

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Variantes del sistema para generación de shRNAs



- ***Expresión inducible de shRNAs***
- ***Expresión de múltiples shRNAs***

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Expresión inducible de shRNAs

- En estos **sistemas**, existe un **elemento de secuencia** que **controla la transcripción del gen** que expresa los shRNA.
- Uno de los sistemas más utilizados es el **sistema inducible por tetraciclina**.
- La simple **adición del antibiótico** (tetraciclina o doxiciclina) **desbloquea** el **gen** (Tet-On), mientras que su **remoción** lo **bloquea** (Tet-Off).

iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Expresión inducible de shRNAs

- El **sistema contiene** un la **secuencia operadora Tet** *downstream* al promotor (**TetO**).
- También, contiene un **gen** que codifica una **proteína transactivadora** (**Tet repressor**).
- La proteína **Tet repressor** se **une** muy eficientemente a **TetO**, **evitando** la **transcripción**.
- La simple **adición** de **tetraciclina** o de **doxiciclina** forma un **complejo** con la **proteína represora**, la cual deja de unirse a TetO.

iRNAs en biología

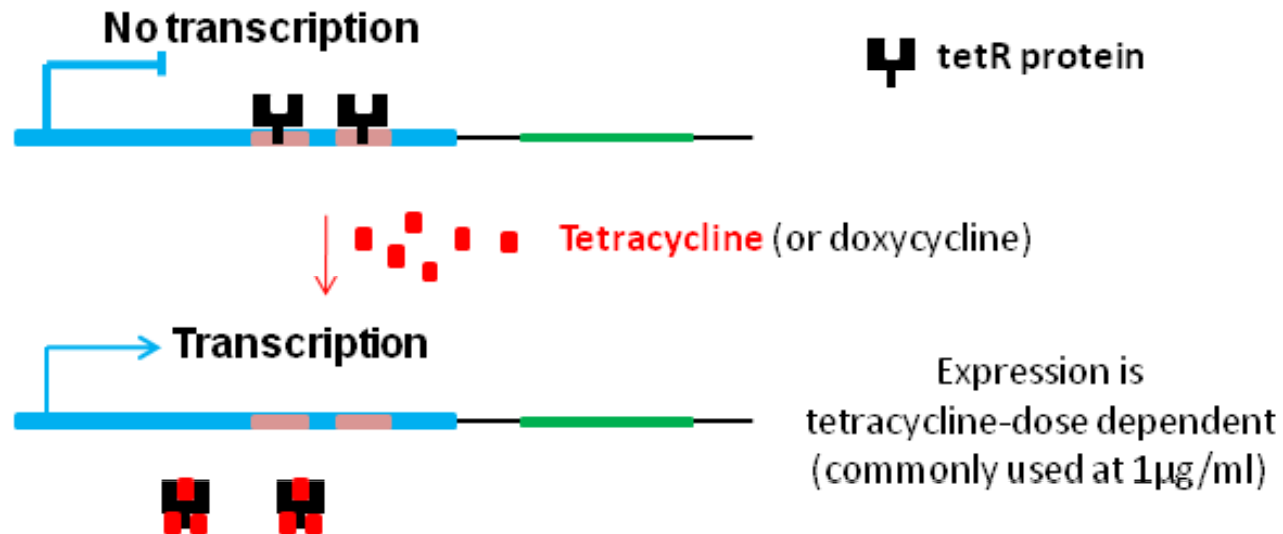
Generación de shRNAs

Expresión inducible de shRNAs

!TTCOCTATTCAGTGATAGAGACT!

Tet operator

Inducible system



iRNAs en biología

Generación de shRNAs

Expresión de múltiples shRNAs

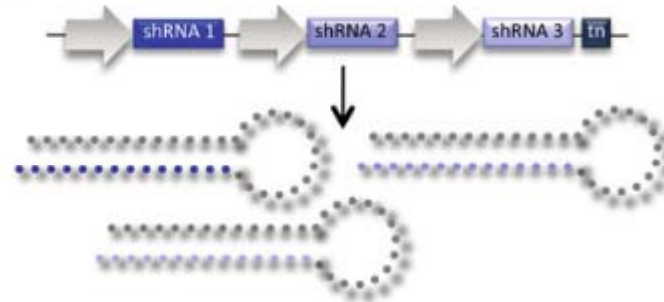
- Es posible expresar varios shRNAs a partir de una **única construcción**.
- Esto se ha intentado construyendo **varios genes** en un mismo plásmido.
- Aunque también se ha realizado generando **1 gen** que expresa un **dsRNA** grande.

iRNAs en biología

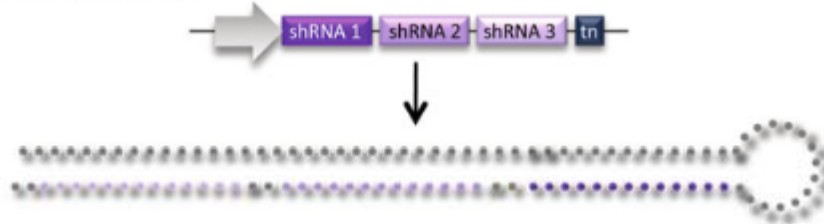
Generación de shRNAs

Expresión de múltiples shRNAs

Multiple promoter shRNA



Long hairpin RNA/Extended shRNA



**¿Cuáles son los mecanismos
de vehiculización más
utilizados para siRNA y
shRNA?**



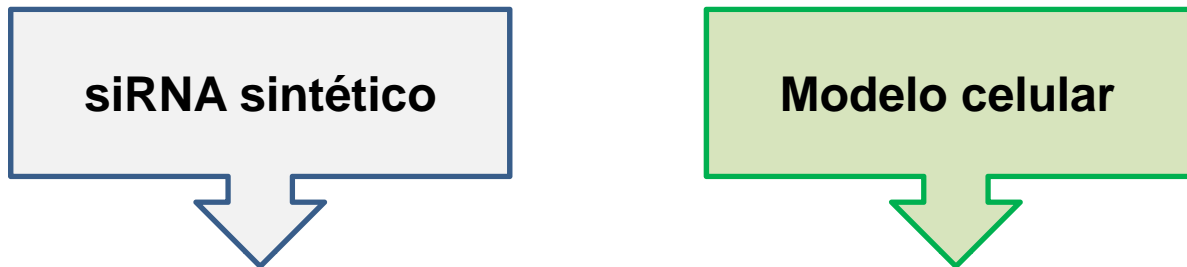
iRNAs en biología

Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

- Ya generados los siRNAs sintéticos o realizada la construcción genética para la biogénesis de shRNA, es necesario utilizar un sistema de *delivery* o vehiculización de los ácidos nucleicos en las células deseadas.
- La aplicación de iRNA puede ser en cultivo celular o en organismos, siendo en ambos casos diferente la aproximación.
- Por otro lado, los siRNAs sintéticos siempre tendrán un efecto transitorio, mientras que las construcciones para generar shRNA pueden establecerse de manera definitiva.

siRNAs en biología

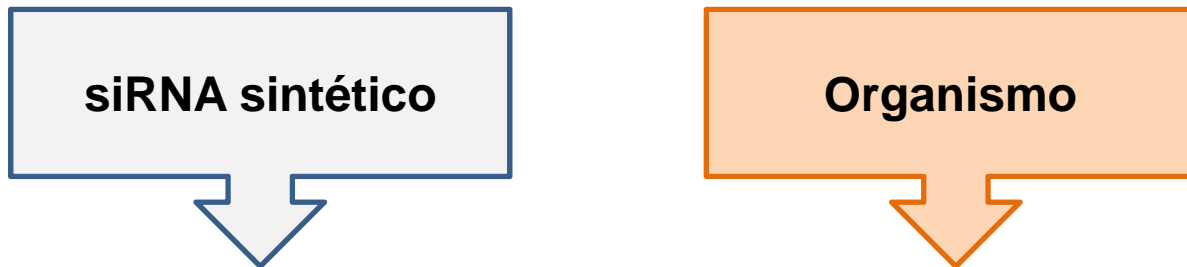
Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El **procedimiento clásico** es la **transfección** (lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio).
- En este diseño experimental, es importante **contar con un control negativo de siRNA**.
- También es importante **poner a punto la transfección** con un **plásmido control** que **expresa una proteína indicadora**.
- El **análisis** de la eficiencia del silenciamiento debe realizarse mediante **Northern Blot**, **RT-qPCR** y/o **Western Blot**.

siRNAs en biología

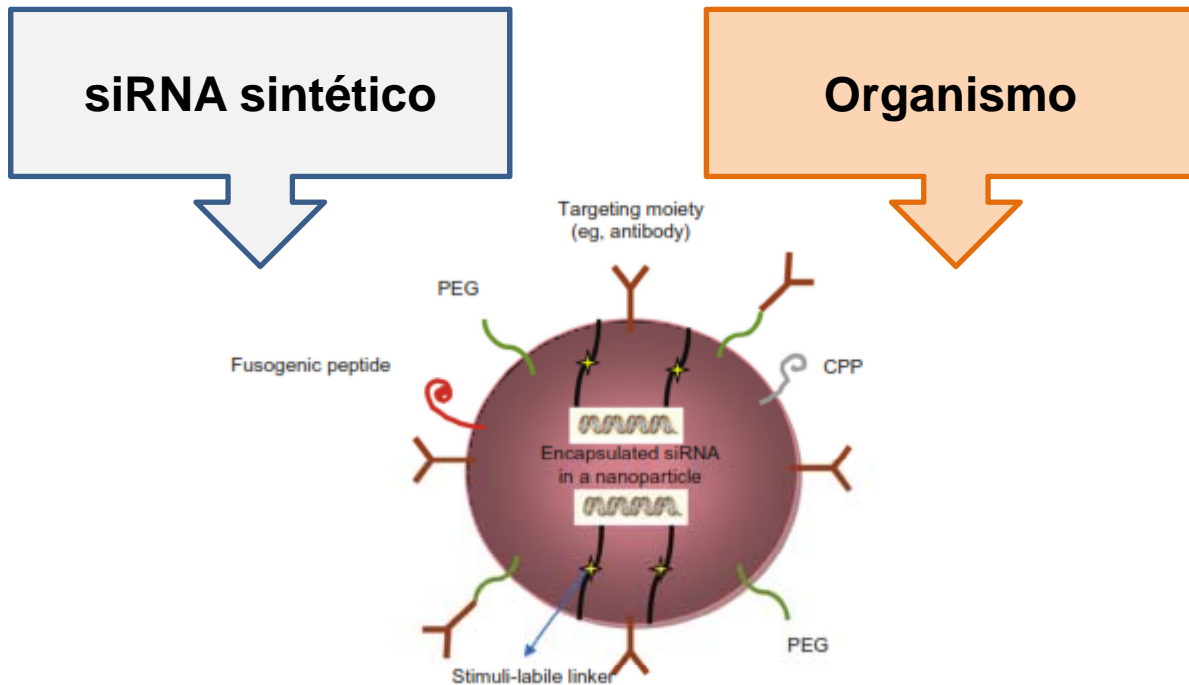
Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El uso de **siRNAs sintéticos** en **organismos** tiene **aplicaciones biomédicas**.
- En estos casos, es **complejo** direccionar el **siRNA** a las **células diana**.
- Si bien **se puede administrar siRNA desnudo**, es **conveniente** armar **complejos** que conduzcan a una **mayor vida media** y a una **mejor biodistribución**.

siRNAs en biología

Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



Component	Design goal
siRNA complexed in a cationic polymeric nanoparticle	Protection from enzymatic degradation; efficient transport and cellular uptake
Polyethylene glycol (PEG) shell	Retarded clearance by RES and renal filtration; reduced toxicity
Targeting moiety (eg, folic acid, peptide or antibody)	Specific binding to target tissue/cell
Cell-penetrating peptide (CPP)	Enhanced cellular internalization
Fusogenic peptide or lipid, or endosome destabilizing polymer	Facilitated siRNA release from the endosome
Stimuli-labile linker	Efficient siRNA dissociation from its carrier in the cytoplasm

iRNAs en biología

Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

Table 4 Ongoing clinical trials in cancer and other diseases

Clinical setting	Product	Targeted gene	Location	Disease	Admin	Phase	Stage
Cancer							
1	Proteasome siRNA and tumor antigen RNA-transfected dendritic cells	Immunoproteasome	USA	Melanoma	Vaccination	I	Recruiting
2	SV40	Tyrosine kinase	Israel	CML	–	–	Completed
3	CALAA-01	Ribonucleotide reductase (M2 subunit)	USA	Cancers	IV	I	Recruiting
4	Atu027	An siRNA	Germany	Advanced solid cancer	IV	I	Recruiting
5	TKM-080301	PLK1 gene product	USA	MCRC(liver); MPC(liver); MGC(liver); MBC(liver); MOC(liver)	Intra-arterial	I	Recruiting
6	AHR siRNA	Aromatic hydrocarbon receptor	Taiwan	Neuroblastoma	–	–	Completed
7	siG12D LODER	–	Israel	PD-Adk; PC	–	I	Recruiting
8	B4GALNT	–	Taiwan	Neuroblastoma	–	–	Completed
Others							
1	AGN211745 siRNA027	VEGFR receptor-I	USA	CNV-AMD	IVT	I/II	Completed*
2	AGN 211745; ranibizumab	VEGFR receptor-I	USA	AMD	IVT	II	Terminated
3	td101	Keratins, K6a	USA	Pachyonychia C	Intradermal	I	Completed
4	QPI-1007	Caspase 2	USA	Optic atrophy;	IVT	I	Recruiting

iRNAs en biología

Delivery de siRNA y construcciones de shRNA

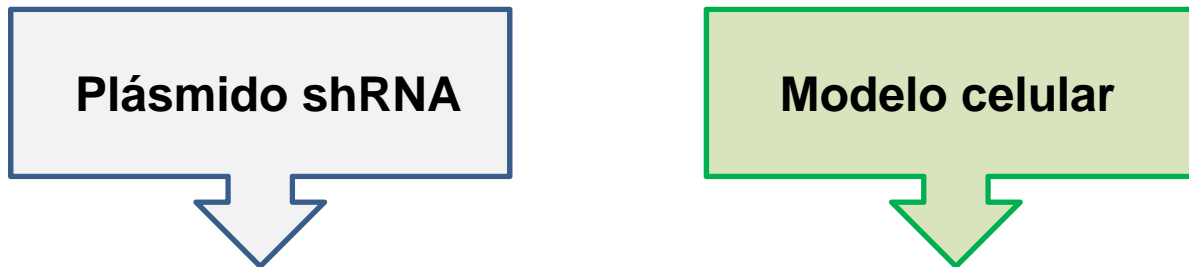
Clinical setting	Product	Targeted gene	Location	Disease	Admin	Phase	Stage
5	Bevasiranib	VEGF	USA	N-AAION DME	IVT	II	Completed
6	PRO-040201; placebo	–	USA	Hypercholesterolemia	–	I	Terminated
7	–	IL-10	Taiwan	Preeclampsia	–	–	Terminated
8	SYL1001	–	Spain	Ocular pain; dry eye	Topical	I	Recruiting
9	Bevasiranib; ranibizumab	VEGF	–	ARMD	IVT	III	Withdrawn
10	I5NP; placebo	p53	USA	Injury of kidney Ac renal failure	IV	I	Completed
11	I5NP; saline	p53	USA	Delayed graft function; other complication of kidney transplant	IV	I/II	Recruiting
12	SYL040012	β 2adrenergic receptor	Spain	Glaucoma; ocular Hypertension	Local	I/II	Recruiting
13	Simvastatine	Keratin (K6a-K17)	Israel	Pachyonychia C	Topical	I	Not yet recruiting
14	TBX3	TBX3	USA	Human ES cell differentiation	–	–	Unknown
15	Bevasiranib	VEGF	USA	MD	IVT	II	Completed
16	PF-04523655; PF-04523655 and ranibizumab; ranibizumab; PF-04523655	–	USA	Choroidal Neovascularite Diabetic retinopathy DME	IVT	II	Not yet recruit

Abbreviations: MCRC, metastatic colorectal cancer; MPC, metastatic pancreatic cancer; MGC, metastatic Gastric cancer; MBC, Metastatic Breast cancer; MOC, Metastatic Ovarian Cancer; PD-ADK, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PC, Pancreatic Carcinoma; Pachyonychia C, Pachyonychia Congenita; N-AAION, Non-Arteric Anterior Ischemic Optic Neuropathy; DME, Diabetic Macular Edema; ARMD, Age Related Macular Degeneration; MD, Macular Degeneration; CML, Chronic Myeloid Leukemia; AMD-CNV, Age-Related Macular Degeneration- Choroidal Neovascularization; AMD, Age-Related Macular Degeneration; IVT, Intravitreal Therapy.

Miele E, Spinelli GP, Miele E, Enzo Di Fabrizio, Ferretti E, Tomao E, Gulino A. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. International Journal of Nanomedicine 2012;7 3637–3657

iRNAs en biología

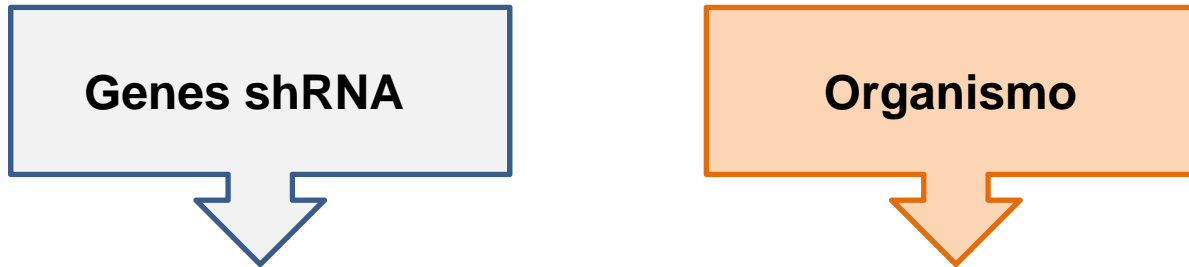
Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El **procedimiento clásico** es la **transfección** (lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio).
- En este diseño experimental, es importante **contar con un control negativo de shRNA**.
- También es importante **poner a punto la transfección** con un **plásmido control** que **expresa** una **proteína indicadora**.
- El **análisis** de la eficiencia del silenciamiento debe realizarse mediante ***Northern Blot***, **RT-qPCR** y/o ***Western Blot***.

iRNAs en biología

Delivery de siRNA y construcciones de shRNA



- El uso de **genes que expresen shRNA** en **organismos** requiere de la **vehiculización** mediante **sistemas virales o no virales**.
- Los **sistemas no virales** son **similares** a los empleados para los **siRNAs sintéticos**.
- Los **sistemas virales** implican **incorporar el gen en el genoma de un virus**, el cual en función de su tropismo transportará dicha secuencia terapéutica a la célula diana.
- Los **virus** más utilizados fueron **retrovirus, adenovirus, adeno-asociados, herpes virus**.